

Prosjektoppgave i profesjonsstudiet i medisin

Naturlige dreperceller og Listeriainfeksjon

Kristian Sydnes

Veileder: Prof. dr. med. Bent Rolstad

Anatomisk institutt

Universitetet i Oslo

<i>Innhold</i>	Side
Abstract	3
Immunforsvar	4
- Det adaptive immunforsvar	4
- Naturlig immunforsvar	6
- Naturlige Dreperceller	7
Listeria Monocytogenes	8
Hensikt	10
Materiale og metode	11
- Bakterier	11
- Dyr	11
- Eksperimentell prosedyre	11
- Flowcytometri	12
Resultater	12
- Dose-respons	12
- Kinetikk	13
- Stammedistribusjon	14
- Deplesjon av NK-celler	15
- LM-infeksjon i athymiske rotter	16
- Endring i frekvens av NK-populasjoner som uttrykker Ly49-reseptorer etter LM infeksjon	17
Diskusjon	18
Referanser	20

Abstract

Natural killer (NK) cells are likely involved in the control of early phase of the intracellular bacterial *Listeria Monocytogenes* (LM) -infection, as the athymic nude rats, which have increased NK activity and minimal T-cell activity, are more resistant to early bacterial growth than wild type rats. The expression of Ly49 receptors vary between different rat strains. We investigated PVG-, AO- and DA-rats and found no correlation between growth of LM *in vivo* and expression of Ly49. Further, NK cell depletion *in vivo* with the mAb anti-NKR-P1A/B, lead to an increased splenic bacterial load. In rats infected with LM the splenic Ly49+ subset increased significantly, while the Ly49- subset decreased.

Immunforsvaret

Immunforsvaret er en livsnødvendig mekanisme som beskytter alle multicellulære organismer mot mikrobiologiske infeksjoner. Evolusjonen har gitt komplekse sammensatte forsvarsmekanismer som gjør det mulig ikke bare å leve i samspill med mikroorganismer, men også eliminere disse når de invaderer organismen. Hos pattedyr er immunforsvaret i hovedsak likt oppbygget og den gruppen av celler, vev og molekyler som medierer motstand mot infeksjon kalles immunsystemet. Immunrespons er dettes koordinerte reaksjon på infeksjon.

Man kan se immunsystemet som et komplisert byggverk av delvis overlappende komponenter, bygget for å forsvare organismen mot alle eventualiteter som kan gi tap av funksjon og dermed liv. Mikroorganismene på sin side vil forsøke å trenge gjennom dette med alle midler og utvikler løpende strategier for å klare dette. Dette kappløpet har gitt et meget komplekst immunsystem som svar på disse unnslippelsesstrategiene.

Det adaptive immunforsvar

Immunsystemet deles inn i non-adaptiv (medfødt, naturlig) immunitet og adaptiv (ervert, innlært) immunitet. Det som skiller det adaptive fra det non-adaptive immunsystemet er den finjusterte spesifisiteten for distinkte antigener og evnen til hukommelse. Det adaptive immunforsvar utgjøres av B- og T-cellene. Denne delen av immunforsvaret har evnen til å skille mellom mange hundre millioner antigener eller deler av antigener. Av en enkel lymfocytprogenitor kan det utgå cellekloner som gjenkjenner ett enkelt antigen. Denne cellen eller celleklonen har reseptorer som er antigenspesifikke og diversiteten av ulike reseptorer som har evnen til å gjenkjenne forskjellige antigener kalles reseptorreportoar. Disse reseptorene er til stede på lymfocytene før organismen er blitt utsatt for infeksjon, noe hypotesen om klonal seleksjon foreslo allerede på 1950-tallet.

Disse spesifikke antigenreseptorene produseres av B- og T-celler. B-cellene produserer immunglobulin-reseptorprodukter med samme spesifisitet som Ig reseptoren mens T-cellene har T-celle-reseptoren (TCR) i sin cellemembran. B-cellene dannes i benmargen som naive B-celler. Ved infeksjon rekrutteres disse til germinalsentrene i sekundært

lymfatisk vev (lymfeknuter, milt, MALT) hvor de gjennomgår somatisk hypermutasjon for å bedre affiniteten til de membranbundne antistoffene. Antigenet fagocytteres av B-cellen og presenteres for T-hjelpercellene på MHC klasse II molekylet. T-hjelpercellene stimulerer så B-cellene til å gjennomgå forandring til plasmaceller og hukommelses-B-celler. Plasmacellene har evnen til å produsere store mengder sirkulerende antistoffer som eliminerer det infektøse agens, mens hukommelses-B-cellene fortsetter sin sirkulasjon og vil respondere raskt ved senere infeksjon med samme agens.

Evnen til å presentere antigener er en essensiell del av den adaptive del av immunforsvaret. Alle kjerneholdige celler i kroppen uttrykker MHC klasse I på overflaten. Peptider som presenteres på disse har endogen opprinnelse, og er hentet fra cytosol gjennom den endocytotiske ruten for prosessering av antigener. Mikrober som unslipper endosomet blir oppfattet som endogene peptider men av patogen opphav. På den måten blir infiserte celler oppfattet som syke og eliminert av CD8 positive T-celler på lik linje med celler som av ulike årsaker har forandringer i sitt DNA som for eksempel ved kreft.

I all hovedsak uttrykkes MHC klasse II på antigenpresenterende celler (APC). Dette er celler som makrofager, monocytter, mikroglia, kupfferceller og dendritiske celler (DC). DC er de eneste profesjonelle APC og de eneste som presenterer antigener for naive CD4⁺ T-celler. MHC klasse II presenterer peptider som har gjennomgått prosessering via den eksosytotiske ruten og uttrykker derfor signaler som forteller at organismen er infisert av mikrober som APC har lyktes i å eliminere uten selv å ha blitt infisert.

B-cellene står for den humorale del av det adaptive immunforsvar. T-cellene står for det cellulære forsvar mot mikroorganismer. De antigenpresenterende celler bryter ned mikroorganismen og presenterer deler av dennes proteiner - peptider - på sine MHC-molekyler. Disse presenteres for T-cellene som reagerer på fremmede peptider. De CD8⁺ Tc-celler gjenkjenner MHC klasse I molekyler. Dersom det finnes et fremmed peptid her, lyseres den infiserte cellen.

T hjelper (Th)-cellen gjenkjenner antigener som presenteres på MHC klasse II molekyler på APC som makrofager og dendritiske celler, som oftest i paracortex. Gjennom denne stimulansen differensieres cellen og prolifererer til effektor Th-celler og de migrerer

nærmere follikelen hvor de stimulerer B-celler som presenterer antigenet på sine MHC klasse II molekyler. Th-cellene utskiller også cytokiner som IFN-gamma. Dette stimulerer blant annet makrofagene til økt aktivitet.

Naturlig immunforsvar

I motsetning til det adaptive immunforsvar, som må stimuleres og tilpasses i møtet med mikrober før det er effektivt, er det naturlige immunforsvar bygget for å gjenkjenne strukturer som er felles for hele grupper av mikroorganismer.

Fagocytterne (nøytrofile granulocytter og monocytter/makrofager) utgjør en viktig del av det cellulære naturlige immunforsvar. I blodet finner man store mengder nøytrofile granulocytter. Normalt finner man 4-10 000 av disse cellene pr mm³ blod. ved infeksjoner kan antallet øke til 20 000 pr mm³ blod. Disse cellene er mest effektive når de rekrutteres til ekstravasale infeksjonssteder med høye mikrobekonsentrasjoner. Dette skjer ved stimulering av ulike cytokiner som bindes til fagocyttoverflaten og gir adhesjon til endotel og endringer i cytoskjelettet som muliggjør ekstravasering.

Fagocytterne gjenkjenner mikrober ved hjelp av mange ulike overflatereseptorer som er spesifikke for mikrobiologiske produkter. Toll-lignende reseptorer (TLR) er reseptorer som er strukturelt like, men som kan gjenkjenne ulike bakterielle lipoglykaner som lipopolysakkarid/endotoxin (LPS) og flagellin. De intracellulære signalene som dannes av TLR genererer en transkripsjonsfaktor som stimulerer produksjon av cytokiner, enzymer og andre proteiner som er involvert i de antimikrobielle funksjonene til aktiverte fagocytter. Mannosereseptoren har en rekke repeterende sekvenser som binder mannose på mikrobeoverflaten, og når denne reseptoren stimuleres av en tilstrekkelig mengde mannose, aktiverer den intracellulære signaler som gir fagocytose av mikroben.

Selve drapet av mikroben skjer etter fagocytose hvor fagosomet fusjonerer med lysosomer som inneholder antibakterielle enzymer. Etter drapet presenterer fagocytterne, og da særlig makrofagene, mikrobepeptider på sine MHC klasse I og II molekyler. Dette utgjør et viktig bindeledd mellom andre komponenter av immunforsvaret. Peptidene presenteres på overflaten etter intracellulær prosessering på to måter. I den cytosoliske ruten fanges opp peptider av ER i cytosol. Disse kan være både egne og fremmede. Deretter presenteres de på overflaten av MHC klasse I som de CD8⁺ T-cellenes TCR bindes til. I den endocytotiske

ruten har mikroben blitt fagocyttert og drept og peptidfragmenter fra denne finnes i en endocytotisk vesikkel som smelter sammen med vesikler inneholdende MHC klasse II i membranen. Her bindes peptidene til MHC klasse II og deretter presenteres disse på overflaten hvor de bindes til de CD4+ T-cellenes TCR.

Komplementsystemet, cytokiner og andre plasmaproteiner utgjør den humorale del av det naturlige immunforsvar. Komplement er sirkulerende og membranbundne proteiner som gir et viktig bidrag i forsvaret mot mikrober. Disse proteinene har evnen til å binde seg til mikrober og enten opsonisere eller lysere disse.

Som respons på infeksjon utskilles det cytokiner fra ulike grupper celler. Cytokinene er proteiner som medierer inflammasjon og immunreaksjoner. De fleste av disse cytokinene kalles interleukiner da de skekres av leukocytter og medierer sin effekt på leukocytter. Effekten av cytokinene er blant annet viktige funksjoner som rekruttering og aktivering av immunceller.

Andre plasmaproteiner er også viktige i det humorale naturlige immunforsvar. Mannosebindende lektin (MBL) har mye til felles med makrofagens mannosereseptor, men sirkulerer i blodet og binder seg til mikrober. Derved klargjøres mikroben for fagocytose ved at den lettere oppdages og bindes til fagocytter. C-reaktivt protein (CRP) bindes til forsyrylcholin på bakterieoverflaten og har noe av den samme effekten som MBL. Sammen utgjør de en del av akutfasereaksjonen, og de kalles derfor akutfaseproteiner.

Naturlige Drepeceller

Den naturlige drepercellen ble oppdaget på 1970-tallet. Man undersøkte T-cellenes evne til å drepe kreftceller og oppdaget at noen celler var i stand til å drepe disse uten forutgående stimulans som cytotoxiske T-celler er avhengige av. Morfologisk er de store granulære lymfocytter. Først fikk cellene navnet "non-spesifikke" lymfocytter, senere navnet Natural Killer Cell (NK-celler). Disse utgjør 5-10% av lymfocytene i blodet. Det ble senere ved dyreeksperimentelle modeller vist at cellene spilte en rolle i forsvaret mot virus og intracellulære bakterier. Man ble tidlig klar over NK-cellens evne til å drepe celler med manglende ekspresjon av MHC, noe som kan forekomme både hos virusinfiserte celler og som følge av mutasjoner. De mangler T-celle reseptor (TCR), men har flere ulike reseptorer som gjenkjenner de antigenpresenterende HLA/MHC molekyler. NK-cellene produserer et

vidt spektrum med cytokiner som hematopoietiske faktorer, kolonistimulerende faktorer og gammainterferon.

Økende kunnskap om NK-cellen har vist dens rolle i gjenkjennelse av patogener, og kunnskapen om dens reseptorer har vokst voldsomt de senere år. Humane NK-celler har en rekke reseptorer for HLA-molekyler, spesielt for klasse I (MHC-I-molekyler). Disse reseptorene – killer immunoglobulinlike receptors (KIR) og CD94/NKG2 – kan både stimulere og inhibere NK-cellens funksjoner, og man har postulert at cellens funksjon er avhengig av et intrikat samspill mellom patogener, reseptorer, andre immunceller og cytokiner.

Funksjonene til humane NK-celler antas å være svært like de man finner i andre pattedyr. Mest forskning er gjort på rotter og mus. Derfor vil mye av de kunne gi viktig informasjon om gjenkjenningsstrategier og andre funksjoner hos humane NK-celler. Navnsetting på overflatemarkører, reseptorer m.v. er ikke lik. Rotter og celler fra disse, som er brukt våre forsøk, har sin egen nomenklatur. De funksjonelle analogene til KIR-reseptorer kalles i mus og rotte Ly49-reseptorer. Både rotter og mus har et vidt reportoar av Ly49-reseptorer som kan gjenkjenne ulike MHC-I-molekyler. Ulike Ly49-reseptorer kan både aktivere og inhibere NK-cellene ved gjenkjenning av nonklassiske og klassiske MHC-I molekyler. Det er beskrevet en rekke subsett av Ly49 reseptorene som er både stimulatoriske og inhibitoriske. Sammen med Ly49 finnes det i tillegg flere andre inhiberende og stimulerende reseptorer som NKG2D¹⁻³ (stimulerende) og NKR-P1C⁴ (inhiberede) som ikke har MHC-I som ligand. Samspillet mellom disse reseptorene er viktig, og ved manglende inhibisjon – som ved ”missing self”⁵ – stimuleres cellens cytotoksisitet. Man vet lite om Ly49-reseptorenes rolle i de tilfeller hvor fremmede peptider finnes på MHC-I molekyler. For informative artikler om NK-celler og gjenkjenning av MHC-I, se *Immunol. Reviews*; vol 155, 1997.

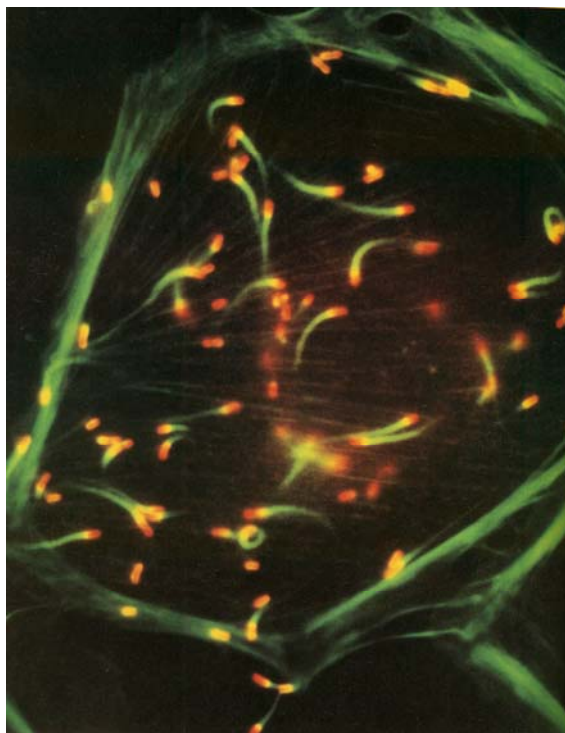
Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes (LM) er en Gram positiv stav som er vidt spredt i naturen. Friske voksne utvikler sjelden sykdom, men bakterien er et kjent og fryktet patogen hos immunsupprimerte pasienter. LM er et fakultativt intracellulært patogen som kan replikere i mononukleære fagocytter. T-celler spiller en viktig rolle i forsvaret mot *Listeria*⁶. Et poreformende cytolysin, listeriolysin, representerer en viktig virulensfaktor som er sentral i den intracellulære overlevelsen fordi dette hjelper bakterien å unslippe fra endosomet til cytosol i vertcellen.

Bakterien finnes naturlig i jord, støv, gjødsel, kloakk, rennende vann, planter og i mat. Spesielt er man oppmerksom på bakterien i upasteurisert melk, og utbrudd av listeriose er oftest matbårne smitteutbrudd.

Mest utsatt for listeriose er immunsuprimerte pasienter (iatrogent eller som følge av sykdom) og hos disse regnes mortaliteten å være høy. Gravide og nyfødte er andre risikogrupper hvor listeriose kan gi alvorlige konsekvenser. Økning av antall eldre og immunsuprimerte pasienter gjør at leger i økende grad vil møte pasienter med listeriose.

LM fagocytoses og entrer vertscellens cytosol ved å utskille listeriolysin O (LLO). Dette proteinet aktiveres av den lave pH i fagolysosomet og lyserer organellen. Dette er et kritisk steg i livssyklus; LM-stammer som mangler LLO er avirulente. I Cytoplasma prolifererer bakterien og migrerer til membrannære områder hvor filopoder som kan integreres i nabocellen dannes. Denne bevegelsen drives av actinfilamenter som festes til bakterien og forlenges slik at bakterien beveger seg i en hastighet av 0.05-0.4 mikrometer per sekund og ”skytes” ut av bakterien. Inne i nabocellen starter syklus på nytt og bakterien har dermed passert fra en celle til en annen uten å være i kontakt med det ekstraecellulære miljø.



Bilde 1: LM-infisert celle med fluorescerende actinfilamenter. LM (rødt) med kometlignende haler av actinfilamenter vandrende langs cytoskjelettet. Med litt fantasi kan man forestille seg hvordan bakterien beveger seg gjennom cellemembranen og inn i nabocelle. Nederst på bildet ser man en allerede infisert nabocelle. (The Cell, Alberts et al, 2002)

LM er på flere måter et bra patogen til bruk i forsøk. Det er lett å dyrke på vanlige bakteriologiske medier, det utgjør ingen stor risiko for personell som jobber med den og den produserer en lett kvantifiserbar eksperimentell infeksjon som når en krise og remiterer innen rimelig tid – 5-7 dager. Forsøksdyr som overlever primærinfeksjon blir meget resistente for reinfeksjon og deres T-celler kan overføre immunitet til naive motagere. CD8⁺ Th-celler gjenkjenner antigener på MHC, både klassiske MHC klasse Ia og nonklassiske MHC klasse Ib⁷. Antigener prosesseres både via den interne (cytosol) og eksterne (endocytotisk) rute og presenteres dermed både på MHC klasse I og MHC klasse II molekyler på celleoverflaten. Disse karakteristika har gjort listeriose til en populær modell ved forskning på cellulær immunitet og man har derved rik erfaring med mikroben i ulike modeller.

Hensikt

Man vet mye om hvorledes T-celler eliminerer infeksjon med LM. NK-cellens rolle er langt mindre kartlagt og er vesentlig knyttet til cytokinrespons på infeksjonen. At Ly49 reseptoren gjenkjenner MHC-I er kjent, men om NK-cellene stimuleres til celledrap som følge av endringer av MHC-I er ikke klarlagt. Vi har etablert en rottemodell for infeksjon med LM for å undersøke:

- 1) om det er korrelasjon mellom bekjemping av LM i rottestammer som fremviser forskjellig LY49-reportoar.
- 2) LM-følsomhet i rotter som har økt NK-aktivitet og ikke har T-celler (atymiske rotter – rnu/rnu) og effekten av å fjerne NK-celler i den samme infeksjonsmodellen.
- 3) endringer i Ly49-reportoar som følge av LM-infeksjon.

Materiale og Metode

Bakterier

Listeria monocytogenes ble isolert fra cerebrospinalvæske fra en mann med Listeriameningitt i 1973. Stammen ble kjøpt fra Nederland og sendt på tre ulike medier og dyrket frem på Trypticase Soy Broth (TSB). Hovedkulturen ble kontaminert, men ren forkultur ble fordelt i reagensrør à 2mL og frosset ned på –80°C. Denne forkulturen ble serotypet på bakteriologisk avdeling på Folkehelseinstituttet; agglutinasjon med anti-4b, og derav mest sannsynlig serotype 4b. Stammen er fra leverandør i Nederland oppgitt å være L242/73 type 4b.

LM ble dyrket i Trypticase Soy Broth (TSB) og frosset ned på dette mediet. Utsåing ble gjort på Trypticase Soy Agar (TSA). LM ble kvalitetssikret ved kontroll av antall CFU før nedfrysing og etter tining – nedfrysing – tining og viste at antallet CFU var upåvirket. Man kunne dermed være sikker på at antallet CFU gitt til forsøksdyr var stabilt.

Dyr

Det ble brukt friske 2-3mnd gamle hannrotter kjøpt fra Harlan Olac (UK) . De ble konvensjonelt oppstallet i dyrestall på Folkehelseinstituttet. Det ble brukt tre innavlede rottestammer; PVG, DA og AO og 1 utavlet stamme Han:rnu/rnu og Han:rnu/+. Dyrene ble bedøvet med Hypnorm før intravenøse injeksjoner i v. dorsalis penis. Avliving ble gjort med CO₂.

Eksperimentell prosedyre

Uttak og videre behandling av organer ble gjort under rene forhold med sterile instrumenter. Organene ble veiet og deretter homogenisert med fosfatbufret 0,9% NaCl (PBS). Homogenisert materiale ble utsådd på TSA i ulike fortynninger og inkubert i 37 grader Celcius i 24t. Organene ble veid og tilsatt PBS slik at totalvolum ble 50ml. Dermed kunne det beregnes antall CFU pr organ og pr gram organ. Man fant det mest konsistent og metodisk riktig å oppgi verdier i CFU pr gram organ da det må antas at funksjon ikke avhenger av organets størrelse, som kunne variere noe. Organvekten viste ikke endringer i infeksjonsforløpet. Antall CFU pr organ og pr gram organ ble beregnet ut fra fortynningen som ga sikreste telling. Bakteriologisk laboratorium ved Folkehelseinstituttet bekreftet at de bakterier man fant i dyrenes organer var de samme som ble gitt intravenøst.

AO ble gitt intraperitoneale (i.p) injeksjoner med anti NKR-P1A/B (3.2.3)^{8;9} for deplesjon av NK-celler. Kontrollgrupper fikk intraperitoneale (i.p.) injeksjoner med 0,9% NaCl. Etter 72 timer fant man deplesjon av NK-celler i dyr gitt 3.2.3. i.p, og dyrene ble gitt i.v injeksjoner med LM. Dyrene ble avlivet 24t senere og milten behandlet som beskrevet ovenfor.

Flowcytometri

Før trippelmerking ble dyrene gitt 2×10^4 CFU LM i.v, milt høstet etter 24t og en del av denne inokulert på TSA som beskrevet ovenfor. Resten av preparatet ble homogenisert i en "cell strainer" og cellesuspensjonen sentrifugert og resuspendert med fosfatbufret saltvann (PBS). Lymfocytter ble isolert fra suspensjonen med lymfoprep og 20 millioner celler behandlet med sau anti rotte Ig-dekkede magnetiske Dynabeads for deplesjon av Ig-positive

celler. Suspensjon ble merket med FITC konjugert anti-NKR P1A/B (3.2.3 FITC) og PE konjugert anti CD3 (G4.18 PE)¹⁰. Merking med ulike biotinylerede reseptorspesifikke antistoffer (se under) med PE-indodicarbocyanin (PE-Cy5)-konjugert streptavidin:

STOK2¹¹ – anti Ly49i2

STOK6¹² – anti Ly49s3

STOK9¹³ – anti KLRh1

STOK27 – anti NKRP.1C

Dar13¹⁴ – anti Ly49s3, -s4, -i3 og -i4

Fly5¹⁵ – anti Ly49s5, -i5 og -s2

Cellene ble analysert på FACScan (BD Biosciences).

Resultater

Dose-respons

Modellen ble etablert først ved å sikre at antallet bakterier som ble gitt den enkelte rotte var likt fra forsøk til forsøk. Frysing av bakterier førte ikke til en reduksjon av antall CFU, slik at antallet CFU gitt pr forsøksdyr var forventet stabilt.

Videre ble rottene gitt LM i.v etter en logaritmisk skala. Ved høyeste dose på 2×10^9 ble enkelte dyr syke og døde. Ved den høyeste dosen (2×10^9 CFU) fant man bakterier i lever, lunger, blod og milt, mens man ved i.v. doser ned til og med 2×10^4 CFU kun fant bakterier i rottene milt. Ved lavere doser enn dette fant man ikke bakterier i rottene overhodet. Ingen av rottene som fikk lavere doser enn 2×10^9 bar klinisk preg av sykdom verken før eller etter injeksjon.

24 timer etter at LM ble gitt i.v, ble rottene avlivet og organer høstet. Milten ble deretter homogenisert sammen med PBS og suspensjonen ble inkubert på TSA i 24 timer ved 37 grader Celsius. Det ble brukt logaritmiske fortynninger av suspensjonen for å få tellbare resultater på agarskalene og den fortynning som gav høyest antall tellbare kolonier ble benyttet (20-200 CFU pr skål) til beregning av antall CFU pr milt.

Tabell X. Antall CFU gjenfunnet i milt 24t etter injeksjon av LM.

CFU i.v	CFU pr. gr. milt (gjsn)	±2SD	n=
2×10^8	$1,90 \times 10^8$	$\pm 0,28 \times 10^8$	5
2×10^6	$2,30 \times 10^6$	$\pm 0,28 \times 10^6$	10
2×10^5	$1,71 \times 10^5$	$\pm 0,56 \times 10^5$	8
2×10^4	$2,20 \times 10^4$	$\pm 0,8 \times 10^4$	8

Tallene angir antall CFU 24t etter i.v injeksjon med LM.

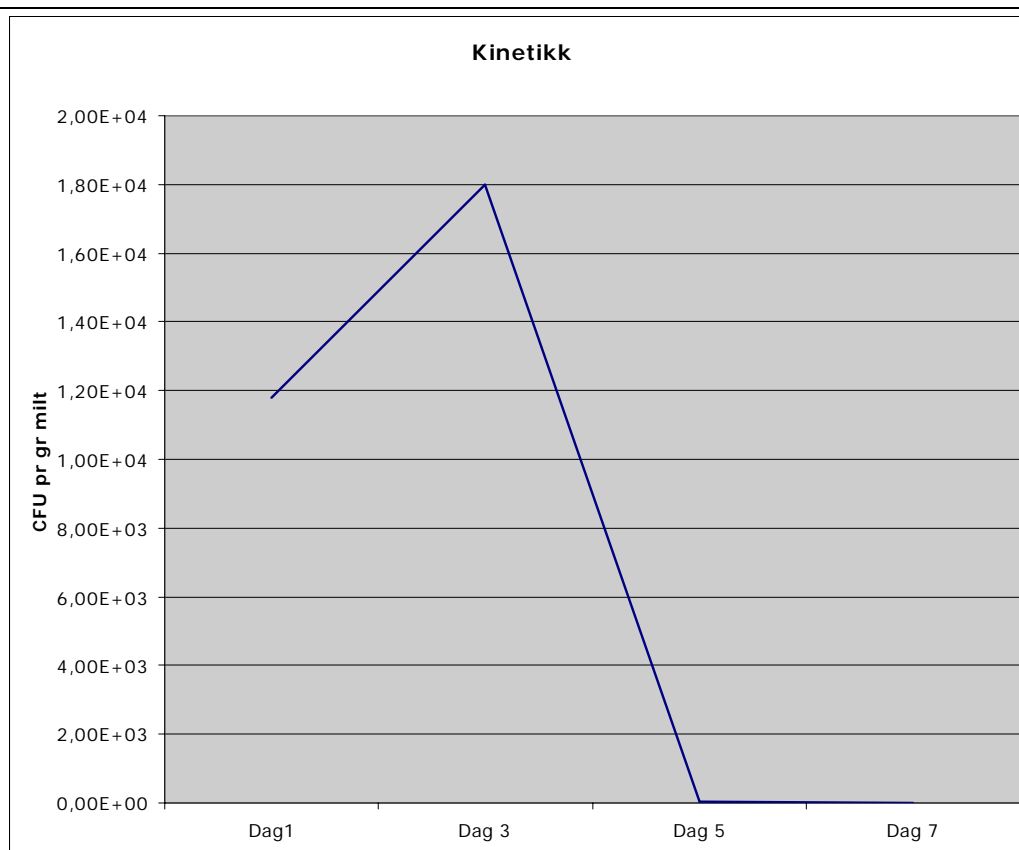
Forsøkene gav konsistente og reproducerbare resultater (Tabell X). Det antallet CFU som ble gitt den enkelte rotte samsvarte i høy grad med det antallet som ble gjenfunnet i den enkelte rottes milt og man sluttet dermed at modellen ville kunne brukes til videre forsøk.

Kinetikk

Det var ønskelig å se på hvorledes rottene taklet i.v injeksjon med LM også over noe tid og kontrollere at det var samsvar mellom vår modell og de modeller som er beskrevet i litteraturen (ref). Man forventet å gjenfinne LM i rottene etter 3 dager, men at det adaptive immunforsvar etter ca 7 dager ville ha eliminert bakterien.

Forsøk ble gjort som ved dose respons og resultatene er delvis hentet fra disse forsøkene hvor milten ble høstet etter 24 timer. I tillegg ble milt høstet etter 3, 5 og 7 døgn.

Figur X. Antall CFU i milten som funksjon av tid etter injeksjon.



Rotter gitt 20 000 CFU LM i.v og organer høstet på dag 1, 3, 5 og 7 og dyrket på TSA. Det ble ikke funnet noen CFU i rotnenes milt etter 7 dager. Dag 1: n=19. Dag 3: n=13. Dag 5: n=4. Dag 7: n=3.

Resultatene var som forventet og bidro til å styrke modellen. Antall rotter avlivet etter 5 og 7 dager var hhv 4 og 3. Man skulle ikke benytte rotter i dette stadiet av infeksjon i videre forsøk og anså metodene for å være godt etablert og sluttet at man ikke trengte å sikre resultatene ut over dette for å kunne bruke modellen videre.

Stammedistribusjon

Uttrykket av Ly49-reseptorer på NK-celler varierer sterkt mellom ulike rottestammer. Således har PVG- og AO-rotter et bredt reportoar av Ly49-reseptorer som kan gjenkjenne mange ulike polymorfe MHC-I molekyler, mens DA-rottens NK-celler stort sett mangler disse reseptorene^{16;17}. Vi ønsket å undersøke om det var forskjeller ved LM-infeksjon mellom disse rottestammene målt ved CFU i milten, som beskrevet ovenfor, og i så fall om dette korrelerte med Ly49-ekspresjonen. Vi undersøkte oppvekst av LM i ulike rottestammer ut fra hypotesen om at de mindre reaktive NK-cellene i DA-rottene ville gi høyere antall CFU i milt i den tidlige fasen av infeksjonen. Denne enkle *in vivo*-modellen ville kunne antyde at NK-cellene er viktige i forsvaret mot LM i en tidlig fase og danne et grunnlag for mer spesifikke undersøkelser av NK-cellenes rolle i forsvaret mot denne infeksjonen.

Tabell X: Vekst av LM i ulike rottestammer.

Milt høstet 24t etter LM-infeksjon	Gjsn	SD	n=
PVG	7,4	2,1	12
DA	9,1	1,9	6
AO	23,7	5,4	7
Milt høstet 72t etter LM-infeksjon	Gjsn	SD	n=
PVG	18,6	18,9	10
DA	12,9	4,3	2
AO	22	-	1

Tabell X viser antall CFU i milt i de ulike rottestammer (PVG, DA og AO) 24t og 72t etter adminisjjon av 2×10^4 CFU LM. Gjsn og SD i 1000.

Man fant ingen signifikant forskjell mellom PVG og DA-rotter, men derimot en klar forskjell mellom disse og AO-rottene. Disse forskjellene var betydelig mindre etter 72t. Følgelig fant man ingen korrelasjon mellom generelt Ly49 ekspresjonsnivå og LM-infeksjon

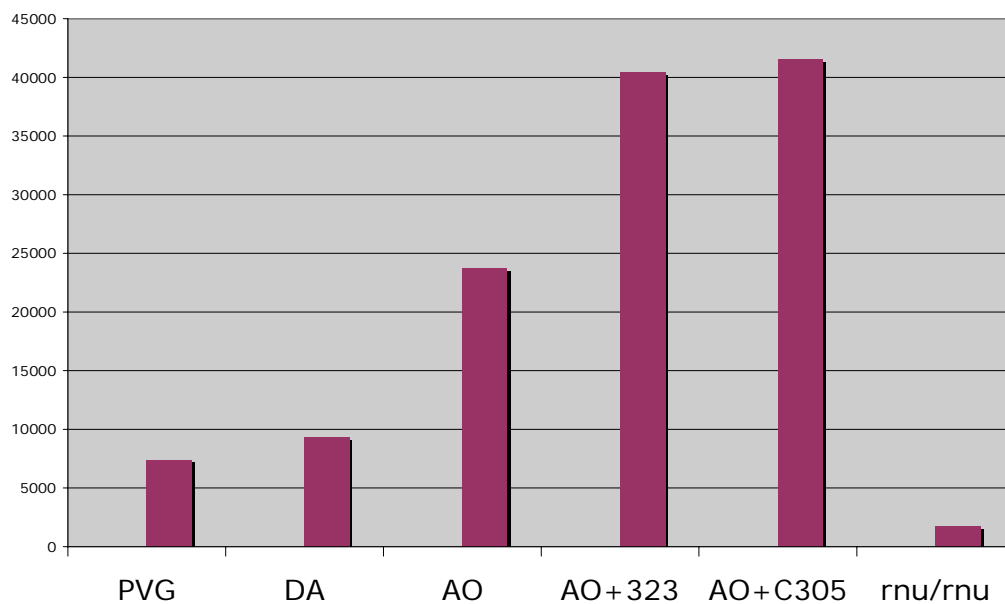
Deplesjon av NK-celler

AO-rotter ble gitt anti-NKR-P1-A/B (3.2.3) intraperitonealt. Dette er den universelle NK-cellemarkøren hos rotte, og man fant etter 72t fullstendig deplesjon av NK-cellene ved flowcytometrisk merking med 3.2.3 og G418 (anti-CD-3) av mononukleære miltceller etter behandling med Dynabeads. Rottene ble gitt 3.2.3 i.p på dag 0, etter 72t ble de samme rotter gitt 2×10^4 CFU LM i.v. 24 timer senere ble de avlivet og milt ble behandlet og dyrket som tidligere beskrevet. Dette ble kontrollert mot AO-rotter gitt et annet antistoff (C305) i.p og mot AO-rotter kun gitt LM i.v. (Figur X)

LM-infeksjon i athymiske rotter (rnu/rnu)

Man brukte også athymiske rotter (rnu/rnu) og ga dem LM etter samme protokoll som nevnt over. Dette er PVG-rotter som mangler thymus og derved mangler funksjonelle T-celler, men har økt antall NK-celler¹⁸⁻²⁰.

Figur X - Stammedistribusjon



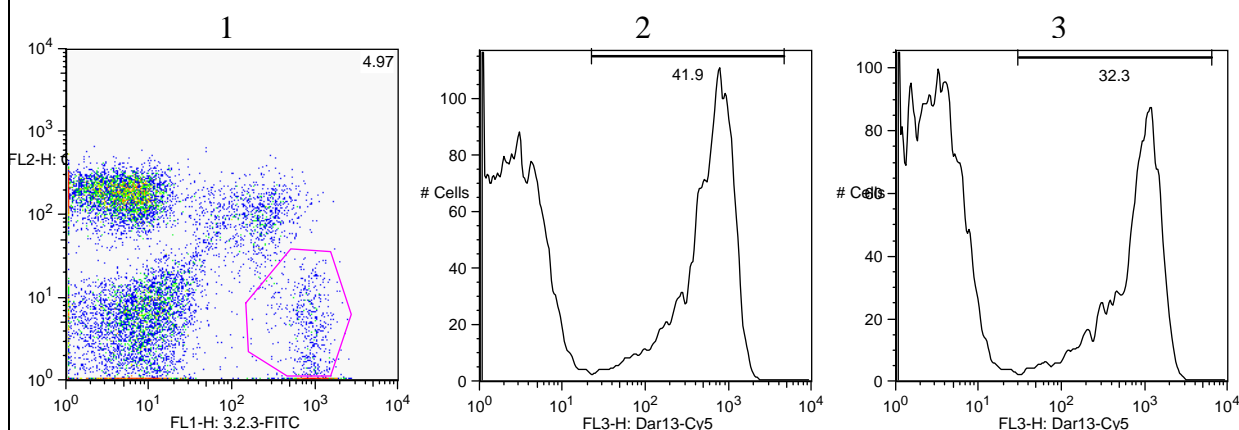
Figuren viser gjennomsnittlig antall CFU gjenfunnet i milt i ulike rottestammer 24t etter administrasjon av 2 x 10⁴ CFU LM i.v. n: PVG-12, DA-2, AO-7, AO+323-5, AO+C305-2, rnu/rnu-3.

Som det fremgår av figuren over er det til dels forskjeller mellom de ulike rottestammene, men som tidligere nevnt liten forskjell mellom PVG og DA. Man fant ikke LM i rnu/rnu-rottenes milt 3 dager etter injeksjon, mens det i PVG-rottene – som er de mest sammenlignbare – var en økning på vel 100%. Man merket seg også den store forskjellen mellom de AO-rotter som var behandlet med 3.2.3 i.p og rnu/rnu. Selv om totalbildet er uklart og består av mange faktorer ga dette holdepunkter for å tro at NK-cellene spiller en rolle ved denne infeksjonen.

Endring i frekvens av NK-subpopulasjoner som uttrykker Ly49-reseptorer etter LM-infeksjon

Ved trippelmerking med de ulike antistoffer ble 10 000 NK celler (NKR-P1A/B+ / CD3-) undersøkt i flowcytometer med tanke på ekspresjon av de ulike Ly49 reseptorer (figur). Dette ble gjort på samme måte for alle de ulike antistoffene, og 3 separate forsøk viste konsistente resultater.

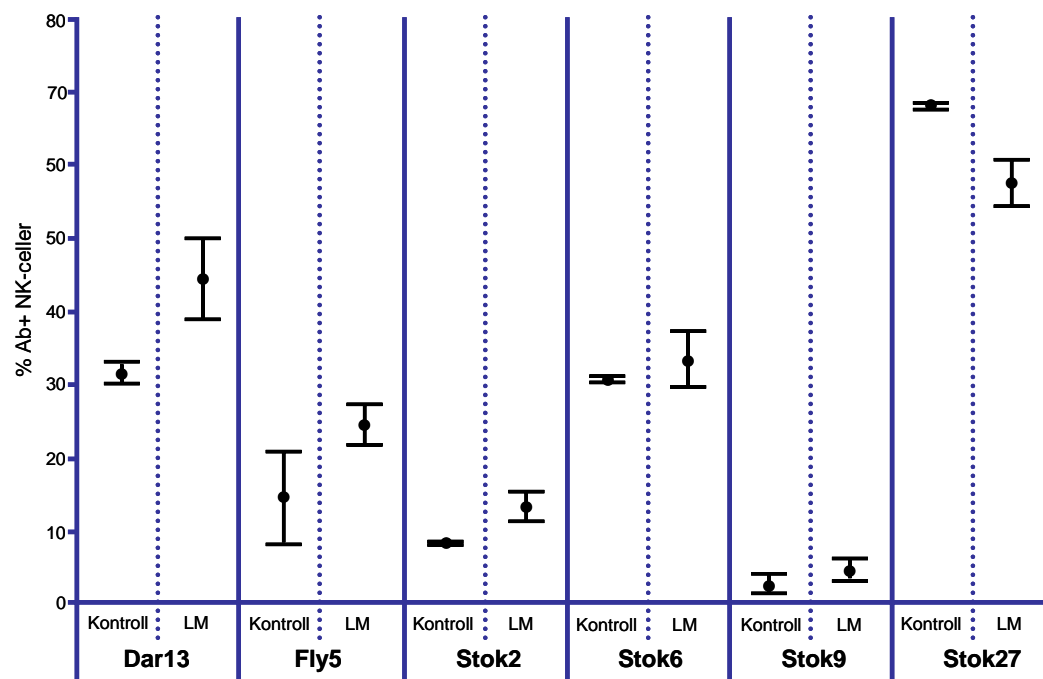
Figur X



Figur viser dot plot (1) med 4 populasjoner celler som funksjon av merking med 3.2.3 FITC og G418 PE. NK-populasjon, som er 3.2.3 FITC-/G418 PE+, er avmerket. Denne NK-populasjonen er gatet ut og man avleser Dar13-Cy5 positive NK-celler som høyreforskjøvede populasjoner i histogrammene. NK-celler fra LM-infiserte dyr (2) og fra kontrollgruppe (3).

Spesielt var det liten variasjon i kontrollgruppen når man sammenlignet de forskjellige forsøkene. Gjennomgående fant man økt frekvens av NK-celler som uttrykker Ly49-reseptorer i de LM infiserte dyrene. Spesielt interessant er økningen i subpopulasjonen med Dar13+ celler som er mAb med alle Ly49-reseptorer som ligand. Samtidig fant vi en reduksjon av Stok27+ (anti-NKR-P1C). NKR-P1C er en reseptor som uttrykkes på Ly49-NK-celler og som man tror har en inhiberende funksjon.

Figur X



Grafen viser prosentvis antall antistoffpositive NK-celler fra PVG-rotter gitt 2×10^4 CFU LM i.v. mot kontrollgruppe gitt 0,9% NaCl i.v. Gjennomsnittlige verdier \pm 2 SD. N = 6 (LM) og 3 (kontroll).

Diskusjon

NK-cellene har et stort repertoar av reseptorer som kan gjenkjenne både MHC-I og andre molekyler både på normale celler og celler som er endret av infeksjon eller malign transformasjon. Innenfor hver klasse av NK-cellerreseptorer finner vi varianter som enten aktiverer eller inhiberer NK-cellene. Vi har her konsentrert oss om familien av Ly49-reseptorer hos rotte. Disse gjenkjenner MHC-I og medierer med denne som ligand enten inhibitoriske eller aktiverende signaler i NK-cellen. Ly-49-reseptorer gjenkjenner polymorfe MHC-I antigener, dvs. MHC molekyler som varierer mellom ulike rottestammer. Hvilken fysiologisk betydning dette har, er ukjent. Det er for eksempel ikke kjent om fremmede peptider (e.g. fra LM) presentert på MHC-I molekyler gir en overvekt av aktiverende signaler fra Ly-49 reseptorer og som en følge av dette vil indukere drap av celler infisert med LM.

Som grunnlag for å angripe denne problemstillingen har vi i denne oppgaven etablert en rottemodell for infeksjon med en intracellulær mikrobe (LM), som både fører til endret ekspresjon av MHC-I på infiserte celler²¹ og der NK-cellene antas å være viktige i førstelinjeforsvaret²².

Vi har i denne modellen sammenliknet LM-infeksjonen i

1. ulike rottestammer med forskjellig repertoar av Ly49-reseptorer
2. rotter med økt NK-aktivitet (athymiske rotter) med normale kontrolldyr
3. rotter der vi har fjernet NK-cellene med antistoff (3.2.3) før infeksjon med LM med med kontroller.

Siden det er lett å "overmanne" det naturlige immunforsvaret med for store doser antigen, var det først viktig å finne den laveste dosen med LM som ga målbar og reproducerbar infeksjon. Etter en nøye dose-respons titering av CFU i milten etter intravenøs injeksjon av bakteriene, ble denne bestemt til 2×10^4 CFU. Milten er det organet i kroppen som har en hovedoppgave i å filtrere ut bakterier som har kommet i blodbanen, og det var utelukkende i dette organet at vi også fant LM etter iv injeksjon med så små mengder bakterier. Siden milten også inneholder store mengder NK-celler, også de med Ly-49 reseptorer, var det naturlig å fokusere videre studier av LM-infeksjon i milten i denne modellen.

To observasjoner som ga holdepunkter for at NK-celler generelt er viktige i førstelinjeforsvaret mot LM var 1) at athymiske rotter syntes å ha større evne til raskt å eliminere LM i milten enn normale kontrolldyr. Dette stemmer overens med flere tidligere studier av NK-celler i athymiske rotter. De kan isoleres fra milten har økt evne til å drepe tumorceller men kan også gjenkjenne MHC-antigener. 2) forbehandling av rotter med et antistoff som eliminerer NK-celler (3.2.3)^{9;23} ga økt antall CFU i milten. Vi må gjøre reservasjon om at i disse forsøkene benyttet vi forbehandling med et isotype-kontrollantistoff (C303) som også ga økt CFU i milten. Dette er en fortynning av ascitesvæske, og vi ønsker å gjøre disse forsøkene på nytt med rensset 3.2.3 og kontrollantistoff.

En sammenlikning av LM-infeksjonen i tre rottestammer, to av dem med NK-celler med et bredt repertoar av Ly-49 reseptorer (PVG og AO) og en av dem med lavt eller fraværende Ly-49 ekspresjonsnivå (DA), ga imidlertid ikke direkte holdepunkter for at ekspresjonsnivået av Ly-49 reseptorer *per se* var utslagsgivende for det tidlige forløpet av infeksjonen i denne modellen (tabell xxx). Vi fant noenlunde samme antall CFU i DA- og PVG-rotter der man ut ifra hypotesen ville ventet en forskjell, og kanskje noe høyere CFU i AO-rotter, der man ville ventet noenlunde samme antall CFU som i PVG. Hvis Ly-49-reseptorer på NK-celler er viktige for å modulere det tidlige forløpet av LM-infeksjon, er det sannsynlig at dette beror på

et samspill mellom disse og andre mer generelt ”aktiverende” reseptorer på NK-celler (e.g. NKG2D).

Vi ønsket derfor å undersøke direkte hvorledes LM-infeksjon påvirker repertoaret av Ly-49-reseptorer på NK-celler isoert fra milten fra dyr tidlig i forløpet av en LM-infeksjon. Med våre antistoff mot spesifikke Ly-49-reseptorer eller undergrupper av dem, kunne vi vise at frekvensen av NK-celler med Ly-49-reseptorer generelt økte (Dar13+ celler), samtidig som frekvensen av Ly-49-negative NK-celler (STOK27+ celler) ble redusert. - Også de subpopulasjonene av NK-celler der vi har antistoffer mot spesifikke Ly-49-reseptorer (e.g. STOK2 antistoffet mot Ly-49-i2) økte i frekvens. At frekvensen av både aktiverende og inhiberende Ly-49-reseptorbærende NK-cellene øker som følge av LM-infeksjon er interessant og kan gi informasjon om hvorledes Ly-49 reseptorrepertoaret avstemmes som svar på en infeksjon.

Videre forsøk vil rettes mot *in vitro* modeller hvor man ser direkte på interaksjonen mellom NK-celler og målceller (e.g. makrofager) infisert med LM. Vi vil studere 1) hvilken effekt LM infeksjon har på ekspresjonen av MHC-molekyler på målcellen 2) hvilken effekt LM infeksjon av målceller har på gjenkjennelse via Ly-49-reseptorer på NK-celler. Slike studier kan gi viktig ny informasjon om hvilken rolle NK-celler og deres reseptorer for MHC-molekyler har i det naturlige immunforsvaret mot intracellulære mikrober.

Referanser

1. Bauer, S., V. Groh, J. Wu, A. Steinle, J. H. Phillips, L. L. Lanier, and T. Spies. 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress- inducible MICA. *Science* 285:727-729.
2. Cerwenka, A., A. B. Bakker, T. McClanahan, J. Wagner, J. Wu, J. H. Phillips, and L. L. Lanier. 2000. Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity*. 12:721-727.
3. Berg, S. F., E. Dissen, I. H. Westgaard, and S. Fossum. 1998. Molecular characterization of rat NKR-P2, a lectin-like receptor expressed by NK cells and resting T cells. *Int. Immunol.* 10:379-385.
4. Kveberg, L., C. J. Back, K. Z. Dai, M. Inngjerdigen, B. Rolstad, J. C. Ryan, J. T. Vaage, and C. Naper. 2006. The Novel Inhibitory NKR-P1C Receptor and Ly49s3 Identify Two

- Complementary, Functionally Distinct NK Cell Subsets in Rats. *J Immunol* 176:4133-4140.
5. Ljunggren,H.-G. and K.Kärre. 1990. In search of the `missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* 11:237-244.
 6. Unanue,E.R. 1997. Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and the T-cell response. *Immunol. Rev.* 158:11-25.
 7. Lara-Tejero,M. and E.G.Pamer. 2004. T cell responses to *Listeria monocytogenes*. *Curr. Opin. Microbiol.* 7:45-50.
 8. Chambers,W.H., N.L.Vujanovic, A.B.DeLeo, M.W.Olszowy, R.B.Herberman, and J.C.Hiserodt. 1989. Monoclonal antibody to a triggering structure expressed on rat natural killer cells and adherent lymphokine-activated killer cells. *J. Exp. Med.* 169:1373-1389.
 9. van den Brink,M.R.M., L.E.Hunt, and J.C.Hiserodt. 1990. In vivo treatment with monoclonal antibody 3.2.3 selectively eliminates natural killer cells in rats. *J. Exp. Med.* 171:197-210.
 10. Nicolls,M.R., G.G.Aversa, N.W.Pearce, A.Spinelli, M.F.Berger, K.E.Gurley, and B.M.Hall. 1993. Induction of long-term specific tolerance to allografts in rats by therapy with an anti-CD3-like monoclonal antibody. *Transplantation* 55:459-468.
 11. Naper,C., S.Hayashi, E.Joly, G.W.Butcher, B.Rolstad, J.T.Vaage, and J.C.Ryan. 2002. Ly49i2 is an inhibitory rat natural killer cell receptor for an MHC class Ia molecule (RT1-A1c). *Eur. J Immunol* 32:2031-2036.
 12. Kveberg, L., Naper, C., Rolstad, B., and Vaage, J. T. Identification of an activating NK cell receptor for an MHC antigen with the monoclonal antibody STOK6. in manus. 2006.
Ref Type: Generic
 13. Naper,C., S.Hayashi, G.Lovik, L.Kveberg, E.C.Niemi, B.Rolstad, E.Dissen, J.C.Ryan, and J.T.Vaage. 2002. Characterization of a novel killer cell lectin-like receptor (KLRH1) expressed by alloreactive rat NK cells. *J Immunol* 168:5147-5154.
 14. Naper,C., S.Hayashi, L.Kveberg, E.C.Niemi, L.L.Lanier, J.T.Vaage, and J.C.Ryan. 2002. Ly-49s3 is a promiscuous activating rat NK cell receptor for nonclassical MHC class I-encoded target ligands. *J Immunol* 169:22-30.
 15. Naper,C., K.Z.Dai, L.Kveberg, B.Rolstad, E.C.Niemi, J.T.Vaage, and J.C.Ryan. 2005. Two structurally related rat Ly49 receptors with opposing functions (Ly49 stimulatory receptor 5 and Ly49 inhibitory receptor 5) recognize nonclassical MHC class Ib-encoded target ligands. *J Immunol* 174:2702-2711.

16. Dissen,E., J.C.Ryan, W.E.Seaman, and S.Fossum. 1996. An autosomal dominant locus, Nka, mapping to the Ly-49 region of a rat natural killer (NK) gene complex, controls NK cell lysis of allogeneic lymphocytes. *J. Exp. Med.* 183:2197-2207.
17. Kveberg,L., K.Z.Dai, E.Dissen, J.C.Ryan, B.Rolstad, J.T.Vaage, and C.Naper. 2006. Strain-dependent expression of four structurally related rat Ly49 receptors; correlation with NK gene complex haplotype and NK alloreactivity. *Immunogenetics* 58:905-916.
18. Reynolds,C.W., T.Timonen, H.T.Holden, C.T.Hansen, and R.B.Herberman. 1982. Natural killer cell activity in the rat. Analysis of effector cell morphology and effects of interferon on natural killer cell function in the athymic (nude) rat. *Eur. J. Immunol.* 12:577-582.
19. Rolstad,B. and H.B.Benestad. 1984. The "natural resistance" to bone marrow allografts in normal and athymic nude rats. Rapid cytotoxic reactions both in vivo and in vitro. *Eur. J. Immunol.* 14:793-799.
20. Rolstad,B. and S.Fossum. 1987. Allogeneic lymphocyte cytotoxicity (ALC) in rats: Establishment of an in vitro assay, and direct evidence that cells with natural killer (NK) activity are involved in ALC. *Immunology* 60:151-157.
21. Pamer,E.G., A.J.Sijts, M.S.Villanueva, D.H.Busch, and S.Vijh. 1997. MHC class I antigen processing of *Listeria monocytogenes* proteins: implications for dominant and subdominant CTL responses. *Immunol Rev.* 158:129-136.
22. Bancroft,G.J. 1993. The role of natural killer cells in innate resistance to infection. *Curr. Opin. Immunol.* 5:503-510.
23. Giorda,R., W.A.Rudert, C.Vavassori, W.H.Chambers, J.C.Hiserodt, and M.Trucco. 1990. NKR-P1, a signal transduction molecule on natural killer cells. *Science* 249:1298-1300.